

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL**



TRABAJO FIN DE GRADO EN CIÈNCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

***IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES
QUÍMICOS EN MIELES MONOFLORALES
ESPAÑOLAS***

Curso 2020-2021

VALENCIA, JULIO 2021

ALUMNA: Ana María Peral Pinto

TUTORA: Isabel Escriche Roberto

COTUTORA: María del Sol Juan Borrás

TÍTULO: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES QUÍMICOS EN MIELES MONOFLORALES ESPAÑOLAS

RESUMEN

El sector de la producción de miel y la Administración necesitan poder caracterizar inequívocamente las mieles monoflorales españolas ya que el fraude en su catalogación da lugar a importantes pérdidas económicas. Esta caracterización se viene realizando mediante la determinación del porcentaje de polen de la especie botánica mayoritaria presente en la miel. Sin embargo, este procedimiento basado en la identificación y cuantificación de los diferentes pólenes, requiere de personal muy experto y está sujeto en muchas ocasiones a la interpretación subjetiva del analista. Por ello, es interesante la búsqueda de técnicas complementarias que permitan de manera inequívoca llevar a cabo una correcta catalogación de las mieles monoflorales. Entre estas metodologías una de las más prometedoras es el análisis de la fracción volátil de las mieles mediante SPME-GC-MS (Microextracción en fase sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas), ya que los compuestos de esta fracción están íntimamente relacionados con la percepción organoléptica que de ellas recibe el consumidor. En este sentido, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la capacidad de la información que proporciona la fracción volátil (analizada por el procedimiento anteriormente citado) en la diferenciación de 5 variedades de mieles monoflorales (azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo). En ellas, se han podido diferenciar 116 compuestos volátiles, de los cuales, únicamente 10 de ellos no mostraron diferencias significativas entre tipos de miel. Se han obtenido compuestos específicos que se han podido asociar a la miel de azahar (4 lilacs A, B, C y D, 1- p-Menthene-9-al y methyl anthranilate, considerado un buen marcador en esta variedad de miel por proceder del néctar de la flor de azahar), de tomillo (butanoic acid , octanal y furan, 3-phenyl) y de lavanda (3-buten-1-ol, 3-methyl-; 2-buten-1-ol, 2-methyl- y furfural). Sin embargo, esto no ha sido posible para las variedades de eucalipto y romero. Este trabajo pone en evidencia que la técnica aplicada (SPME-GC-MS) es idónea para obtener información sobre la fracción volátil de las mieles que sea útil para su diferenciación monofloral.

PALABRAS CLAVE: miel, SPME, marcadores químicos, monofloral.

AUTORA: Ana María Peral Pinto

Valencia, julio 2021

TUTORA: Isabel Escriche Roberto

COTUTORA: María del Sol Juan Borrás

TITLE: IDENTIFICATION OF CHEMICAL MARKERS IN SPANISH MONOFLORAL HONEYS

ABSTRACT

The honey production sector and the Administration need to be able to unequivocally characterize Spanish monofloral honeys and that found in their cataloguing leads to significant economic losses. This characterization has been carried out by determining the percentage of pollen of the majority botanical species present in honey. However, this procedure, based on the identification and qualification of the different pollens, requires highly expert personnel and is often subject to the subjective interpretation of the analyst. For this reason, the search for complementary techniques that unequivocally allow a correct cataloguing of monofloral honeys to be carried out is interesting. Among these methodologies, one of the most promising is the analysis of the volatile fraction of honeys by means of SPME-GC-MS (Microextraction in solid phase-Gas Chromatography-Mass Spectrometry), since the compounds of this fraction are closely related to the organoleptic perception that the consumer receives from them. In this sense, the objective of this work has been to evaluate the capacity of the information provided by the volatile fraction (analyzed by the aforementioned procedure) in the differentiation of 5 varieties of monofloral honeys (citrus, eucalyptus, lavender, rosemary and thyme). In them, 116 volatile compounds have been differentiated, of which only 10 did not show significant differences between types of honey. Specific compounds have associated with citrus honey (4 lilacs A, B, C y D, 1- p-menthene-9-al and methyl anthranilate, considered a good marker in this variety of honey because it comes from the nectar of the citrus), thyme (butanoic acid , octanal y furan, 3-phenyl) and lavender (3-buten-1-ol, 3-methyl-; 2-buten-1-ol, 2-methyl- and furfural). However, this has not been possible for the eucalyptus and rosemary varieties. This work shows that the applied technique (SPME-GC-MS) is ideal for obtaining information on the volatile fraction of honey that is useful for their monofloral differentiation.

KEYWORDS: honey, SPME, chemical markers, monofloral

AGRADECIMIENTOS:

El presente Trabajo final de Grado se ha realizado en el contexto del Proyecto PID2019-106800RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de investigación, en el marco de los programas estatales de generación de conocimiento y fortalecimiento científico y tecnológico del SISTEMA de I+D+i ORIENTADA A LOS RETOS DE LA SOCIEDAD, convocatoria 2019.

Me gustaría agradecer, por todo lo que he aprendido durante la realización de este trabajo final de grado, a mi tutora Isabel Escriche y cotutora Marisol Juan, por su ayuda tanto en la parte experimental como en la redacción del presente trabajo.

También me gustaría agradecer y dedicar este trabajo a mis padres y hermanas por su apoyo incondicional.

ÍNDICE:

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.1.	LA MIEL Y SU COMPOSICIÓN	1
I.2.	TIPOS DE MIEL	3
I.3.	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CLASIFICAR LA MIEL	6
I.3.1.	Métodos clásicos	6
I.3.2.	Métodos actuales	6
I.3.3.	Métodos emergentes	7
II.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	8
II.1.	OBJETIVOS	8
II.2.	PLAN DE TRABAJO	8
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	8
III.1.	MUESTRAS DE MIEL	8
III.2.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL ..	9
III.3.	EQUIPOS, MÉTODO Y CONDICIONES DE TRABAJO	9
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
IV.1.	IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL	10
IV.2.	EFFECTO DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL EN LA DIFERENCIACIÓN DE MIELES DE DISTINTAS VARIEDADES	22
V.	CONCLUSIONES	25
VI.	BIBLIOGRAFÍA	26
VII.	ANEXOS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de pólenes de azahar (a), eucalipto (b), lavanda (c), romero (d) y tomillo (e) (Fuente LABMIEL).

Figura 2. Cromatogramas TIC representativos de la fracción volátil de las mieles de azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo.

Figura 3. Ejemplo de señales identificadas como picos: (a) compuesto Lilac aldehyde D con forma gaussiana y (b) compuesto benzeneacetaldehyde con forma no gaussiana.

Figura 4. Comparación del espectro de masas del compuesto lilac aldehyde D con la librería NIST.

Figura 5. Comparación del espectro de masas del compuesto benzeneacetaldehyde de una muestra de romero con la librería NIST, así como su valor de Match Factor.

Figura 6. Ejemplo de pico no considerado compuesto y comparación de su espectro de masas con el de la NIST.

Figura 7. Ejemplos de diagramas de Box-Whisker de algunos compuestos volátiles que no mostraron diferencias significativas entre variedades.

Figura 8. Ejemplos de diagramas de Box-Whisker de algunos compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre variedades.

Figura 9. Gráfico de puntuaciones de las muestras del Análisis de Componentes Principales (PCA).

Figura 10. Ampliación de la zona central del gráfico de puntuaciones de las muestras del Análisis de Componentes Principales (PCA).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición y características de la miel destinada al consumo humano según el Real Decreto 1049/2003.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS en las 5 variedades de miel estudiadas, ordenados por su tiempo de retención (T_R). Los resultados se expresan en áreas (potencias de 10^6) (valores medios y desviación estándar (SD) así como máximos y mínimos); nd =no detectado. Se incluye el resultado del ANOVA para el factor “variedad” (F-ratio y P-value); significación: * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$, ns =no significativo. Las letras indican los grupos homogéneos del ANOVA.

Tabla 3. Correlaciones entre los compuestos volátiles y los factores para las componentes PC1 y PC2 del Análisis de Componentes Principales (PCA).

Tabla 4. Variedad y códigos de las muestras estudiadas según referencia asignada por LABMIEL.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA MIEL Y SU COMPOSICIÓN

La miel, según la Norma de calidad, se define como “la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure” (Real Decreto 1049/2003).

La miel se compone mayoritariamente de azúcares, especialmente de glucosa y fructosa, y en mucha menor proporción de otras sustancias como ácidos orgánicos, proteínas y minerales (Real Decreto 1049/2003). El contenido mineral difiere según los recursos minerales presentes en el suelo en donde crecen las plantas que visitan las abejas, mientras que el aroma y sabor están relacionados fundamentalmente con origen floral (Juan-Borrás et al., 2014).

La miel puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada parcial o totalmente y el color puede variar desde un tono incoloro a un tono pardo oscuro. Las mieles oscuras tienen mayor acidez y mayor contenido en polisacáridos y minerales, que las de tonalidad clara. La miel durante el almacenamiento cuando es sometida a calor, tiende a oscurecer (Escriche et al., 2008; Escriche et al., 2017).

La composición y características de la miel destinada al consumo humano, se recogen en la tabla 1, según el Real Decreto 1049/2003, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel.

Tabla 1. Composición y características que debe tener la miel destinada al consumo humano según el Real Decreto 1049/2003.

COMPONENTE	VALORES
AZÚCARES	(g/100 g de miel)
<i>Glucosa + Fructosa</i>	
• Miel de flores	≥ 60
• Miel de mielada	≥ 45
<i>Sacarosa</i>	
• En general	≤ 5
• Eucalipto y Citrus	≤ 10
• Lavanda	≤ 15
AGUA	
• En general	≤ 20
• Miel para uso industrial	≤ 23
SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA	
• En general	≤ 0.1
• Miel prensada	≤ 0.5
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	mS/cm
• En general	≤ 0.8
• Miel de mielada	≥ 0.8
ÁCIDOS LIBRES	Miliequivalentes/1000 g
• En general	≤ 50
• Miel para uso industrial	≤ 80
ÍNDICE DIASTÁSICO	Escala de Schade
• En general	≥ 8

• Mieles con bajo contenido natural de enzimas (azahar) y contenido de HMF no superior a 15 mg/kg	≥ 3
HMF	mg/kg
• En general, excepto para uso industrial	≤ 40
• Miel de procedente de origen tropical	≤ 80

Las características químicas y físicas de la miel son importantes debido a que estos parámetros son indicadores de su calidad.

- **CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS**

- **AZÚCARES:** suponen el 80% en peso seco de cualquier miel y son los responsables de muchas de sus características como la higroscopicidad, viscosidad y baja a_w .

- **HUMEDAD (AGUA):** la miel posee propiedades higroscópicas y su contenido en agua determina su grado de conservación. La humedad de la miel puede aumentar durante su extracción y almacenamiento, viéndose favorecida a temperaturas bajas y en un ambiente húmedo, lo que puede provocar su fermentación. En caso contrario, la miel puede perder humedad y volverse más espesa cuando se almacena en un ambiente con poca humedad.

- **SUSTANCIAS INSOLUBLES:** se consideran impurezas, procedentes generalmente de materias extrañas a la miel, como cera, granos de arena, algunas partes del cuerpo de las abejas, entre otros, por lo que influyen en su calidad higiénica.

- **ÁCIDOS LIBRES:** la acidez en mieles fermentadas suele ser más elevada. La acidez libre no debe ser superior a 40 miliequivalentes por kilogramo. Debido a la presencia de ácidos orgánicos, el valor promedio de pH para la miel suele estar comprendido entre 3.0 y 4.5.

- **PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS (ÍNDICE DIASTÁSICO):** la miel es rica en enzimas, siendo la de mayor interés la diastasa, que es muy termolábil y su ausencia indica calentamiento y/o envejecimiento de la miel. El mínimo de diastasas en la escala de Gothe establecido por la ley para la miel es 8. En cambio, la miel posee un contenido muy bajo en compuestos nitrogenados como proteínas y aminoácidos, que se asocia a la presencia de granos de polen, por lo que su detección se ha utilizado como indicador de adulteraciones en mieles comerciales.

- **HIDROXIMETILFURFURAL (HMF):** compuesto que se forma al descomponerse la fructosa en presencia de ácidos. El contenido en la miel aumenta con el incremento de la temperatura y con el tiempo, por ello, se utiliza como indicador de su calentamiento y/o envejecimiento.

- **CENIZAS:** este parámetro no está definido en el Real Decreto 1049/2003. Su valor está relacionado con el contenido de sales minerales presentes en la miel y suele ser proporcional a su tonalidad, en general, cuanto más oscuras mayor es el contenido en minerales y viceversa (De Lorenzo et al., 2002).

- **CARACTERÍSTICAS FÍSICAS**

Las principales características físicas de la miel son la conductividad eléctrica (tabla 1), el color, la cristalización, el índice de refracción, la viscosidad, la densidad, la higroscopicidad y la rotación óptica, siendo la viscosidad y el color las más estudiadas.

- **CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA:** esta propiedad está relacionada con el contenido en sales, a mayor cantidad de sales, mayor conductividad eléctrica. Sirve para diferenciar la miel de néctar de la miel de mielada que tiene mayor conductividad eléctrica (Suescún y Vit, 2008).

- **COLOR:** es una propiedad óptica de la miel que está ligada fundamentalmente a una serie de factores como el origen floral, la composición físicoquímica, las condiciones climatológicas, la presencia de compuestos pigmentarios con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (carotenos, xantofilas, minerales y polifenoles), la maduración, presencia de impurezas y calentamiento inadecuado (De Lorenzo et al, 2002).

- **CRISTALIZACIÓN:** la miel es una solución saturada de azúcares y como tal tiende al equilibrio con la cristalización, que es la precipitación de cristales de glucosa. Puede producirse una separación en la miel en dos fases, una líquida (al producirse una liberación de agua por deshidratación de la glucosa) y otra sólida, de la glucosa cristalizada (De Lorenzo et al, 2002). Estos procesos dependen del origen floral pero también de las condiciones de almacenamiento y procesamiento de la miel.

- **ÍNDICE DE REFRACCIÓN:** el contenido en agua de la miel está en función inversa a su índice de refracción, el cual nos permite determinar la humedad de la miel de forma rápida y precisa.

- **VISCOSIDAD:** propiedad de la miel que depende de su composición química, temperatura y contenido en agua. En general, suele ser muy viscosa en estado líquido, aunque ésta puede variar con el tipo de miel. En ocasiones, una baja viscosidad puede ser un indicador de adulteración de la miel por adición de agua (Suescún y Vit, 2008).

- **DENSIDAD:** la densidad de la miel está comprendida entre 1.39 y 1.44 kg/L. Esta propiedad disminuye de forma lineal con el aumento de la temperatura (°C) y por el contrario aumenta linealmente con el aumento de la concentración (°Brix) (Oroian, 2013).

- **HIGROSCOPICIDAD:** es la capacidad que tiene la miel de capturar agua ambiental. Por ello, tiende a diluirse en la superficie y favorecer el desarrollo de levaduras.

- **ROTACIÓN ÓPTICA:** propiedad de la miel por la que es capaz de hacer girar el plano de polarización de la luz polarizada cuando viaja a través de ella. La dirección de giro y el ángulo de giro específico son magnitudes características, que permiten diferenciar entre miel de néctar (suele ser levógira) y miel de mielada (suele ser dextrógira) (De Lorenzo et al., 2002).

I.2. TIPOS DE MIEL

Según la Norma de calidad relativa a la miel, ésta se puede clasificar atendiendo a su presentación o elaboración, o bien a su origen botánico.

1. Presentación o elaboración

1.1 Miel en panal: tal como es almacenada por las abejas en los alvéolos operculados de panales construidos por ellas recientemente, sin larvas y comercializada en panales, enteros o no.

1.2 Miel con trozos de panal: aquella que contiene uno o más trozos de miel en panal.

1.3 Miel escurrida: aquella que se obtiene al escurrir por gravedad los panales desoperculados y sin larvas.

1.4 Miel centrifugada: aquella que se obtiene al centrifugar los panales desoperculados y sin larvas.

1.5 Miel prensada: aquella que se obtiene al comprimir los panales sin larvas, con o sin aplicación de calor, de hasta un máximo de 45°C.

1.6 Miel filtrada: aquella que se obtiene mediante un proceso de filtración eliminando materia orgánica o inorgánica ajena a la miel, produciéndose una importante eliminación de polen (Real Decreto 1049/2003; Suescún y Vit, 2008).

2. Origen botánico

2.1 Miel de flores o de néctar, es aquella que procede del néctar de las plantas.

En esta categoría se distinguen:

2.1.1 Miel monofloral: procedente principalmente del néctar de una especie floral que contenga más de 45% del polen de esa clase de flor, este porcentaje se ha considerado en las últimas décadas, debido a la falta de concreción en las normas vigentes para determinar el origen botánico de las mieles a través de criterios polinológicos (Rodríguez et al., 2013).

2.1.2 Miel multifloral (mil flores): procedente del néctar de varias especies florales diferentes, en proporciones variables.

2.2 Miel de mielada o mielato: es aquella que procede principalmente de secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas presentes en las partes vivas de las plantas. También es conocida como miel de bosque.

Atendiendo a su origen botánico se comercializa un gran número de variedades monoflorales, siendo las de azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo, unas de las más características del territorio español, por ello, han sido objeto del presente estudio,

- MIEL DE AZAHAR: en los países mediterráneos como Italia y España se cultivan diferentes especies, variedades y cultivares de cítricos para la producción de frutas y de esencias aromáticas. Todos ellos son muy atractivos para las abejas, por ello en estos países se producen grandes cantidades de esta miel monofloral. En España se localiza en Andalucía y litoral del suroeste y sureste de la península, hasta el río Ebro. En España se recolecta en primavera.

El polen de *Citrus spp.* está infrarrepresentado, en mayor o menor medida según las diferentes especies y cultivares. El porcentaje mínimo de polen de *Citrus aurantium*, en general, es > 20%. Las variedades de naranjo cultivadas en España son del grupo Navel mayoritariamente, que se caracterizan por su esterilidad de polen e indehiscencia de anteras para evitar la presencia de semillas. Por ello, valores de polínico de *Citrus spp.* > 5% se aceptan como mieles monoflorales siempre que los valores de methyl anthranilate superen 1.5 ppm (Gómez, 2004).

Las características fisicoquímicas de las mieles de varias especies de *Citrus spp.* son muy similares entre sí, caracterizándose por un color muy claro (<30 mm Pfund), tonalidad blanco-amarillenta,

valores bajos de conductividad eléctrica (<0.3 mS/cm), lenta y moderada cristalización, en cristal fino y un sabor y aroma floral, a fruta fresca, que recuerda el perfume de los naranjos.

- MIEL DE EUCALIPTO: varias especies de *Eucalyptus spp.* fueron introducidas desde Australia en el siglo XX. Pueden encontrarse en países Mediterráneos de Europa, que los cultivan cerca de las costas, principalmente para la industria papelera, por sus aceites esenciales y por sus especies ornamentales.

La producción de miel monofloral de eucalipto es importante en Italia, España y Portugal, siendo la zona de producción en España, la región de Extremadura, litoral sur del Mediterráneo y litoral oeste del cantábrico. Se recolecta en verano y puntualmente en invierno en la zona de Huelva, el *Eucalyptus globulus*.

El polen de *Eucalyptus* está sobrerrepresentado y generalmente laboratorios italianos consideran que una miel es auténtica si al menos tiene un 90% de polen típico de la especie. En España el porcentaje mínimo de polen de *Eucalyptus spp.* para aceptar la miel de eucalipto como monofloral debe ser superior al 70% (Persano y Piro, 2004).

Entre las características fisicoquímicas de estas mieles monoflorales, cabe destacar que tienen una intensidad de color media a oscura, un tono pardo oscuro (40-80 mm Pfund), un olor medio a intenso y un sabor medio con aroma a madera mojada. Su conductividad eléctrica está en torno a 0.8 mS/cm y su cristalización es moderada, en cristales finos.

- MIEL DE LAVANDA: esta monofloral de *Lavandula spp.* se produce principalmente a partir de un híbrido, cultivado por sus aceites esenciales en Francia, España y en menor medida en otros países del sur y del Mediterráneo. La miel de lavanda tiene un alto valor en el mercado y se comercializa internacionalmente. La zona de producción en España se centra en la meseta norte y la época de recolección es en verano.

El polen de lavanda está muy infrarrepresentado e incluso ausente. El porcentaje mínimo de polen de *Lavandula vera*, *L. latifolia*, y sus híbridos es $> 12\%$. En caso de que la planta dominante sea lavandín, híbrido cultivado con alta esterilidad polínica, los granos de polen serán escasos o a medio formar, en cuyo caso se admitirá como porcentaje de monofloralidad un mínimo del 7% (Gómez, 2004).

Las características fisicoquímicas de las mieles de lavanda se caracterizan por valores bajos de conductividad eléctrica (<0.3 mS/cm), cristalización media (en tendencia y en tamaño de los cristales), intensidad de color ligera con tonalidades amarillentas brillantes (30-84 mm Pfund), un olor y sabor medio con aromas a madera, fruta fresca y floral, dejando a veces un regusto a grosella negra.

- MIEL DE ROMERO: *Rosmarinus officinalis* es una planta típica de la vegetación Mediterránea, que crece de forma espontánea a lo largo de la costa y también se cultiva como planta aromática. Es muy atractiva para las abejas.

La miel monofloral de romero se produce en países del Mediterráneo, principalmente en España, norte de África y Turquía. Es muy apreciada por el consumidor por su fino sabor y tiene un buen valor comercial.

La miel de romero se produce en España en zonas calcáreas del centro y sureste de la península y la época de recolección es la primavera temprana.

El polen de romero está infrarrepresentado, siendo el porcentaje mínimo de polen de *Rosmarinus officinalis* para considerarla miel monofloral $\geq 12\%$ (Gómez, 2004).

Entre las características fisicoquímicas de la miel de romero destaca por su baja conductividad eléctrica (<0.3 mS/cm), intensidad de color muy ligera (≤ 35 mm Pfund), con olor y sabor a fresco, floral, fruta fresca y vegetal, con un regusto corto y cristalización moderada, fina si es rico en almendro y gruesa si es rico en rabaniza.

- **MIEL DE TOMILLO:** diferentes especies de *Thymus spp.* se encuentran en países del Mediterráneo como Italia, Francia, España y Grecia, donde se produce la miel de tomillo principalmente. En España se produce en zonas calizas de las dos mesetas peninsulares y estribaciones de los macizos montañosos del sur, siendo las provincias importantes Almería y Guadalajara. La época de recolección es la primavera tardía y el verano.

El polen de tomillo está infrarrepresentado, considerándose miel monofloral con un porcentaje mínimo de *Thymus spp.* $> 12\%$ (Gómez, 2004).

Desde el punto de vista de sus características fisicoquímicas, las mieles de tomillo destacan por tener una intensidad de color media a oscura (40-84 mm Pfund), conductividad eléctrica > 0.3 mS/cm, con un sabor y olor floral, fresco, con un claro componente fenólico, muy intenso y persistente, con un regusto medio y cristalización escasa (Persano y Piro, 2004; Gómez, 2004).

I.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CLASIFICAR LA MIEL

La miel tiene una gran importancia económica, por ello, hay que encontrar formas inequívocas para poder determinar su origen botánico y geográfico. Existen varios métodos clásicos, actuales y emergentes, utilizados para tal fin.

I.3.1. Métodos clásicos

- El análisis de polen, también llamado análisis melisopalinológico, es un método que proporciona una huella digital de la procedencia botánica y geográfica de una miel. Éste consiste en el reconocimiento microscópico de la morfología de los granos de polen que se encuentran en las mieles, procedentes de las diferentes especies botánicas, y la frecuencia con la que aparecen cada una de ellas. Aunque da resultados satisfactorios, en ocasiones hay diferencias considerables entre laboratorios, debido a que no existe un método oficial para llevar a cabo la identificación polínica, por ello no puede ser un método confiable por sí solo (Sobrino, 2020). Esta técnica es tediosa y requiere la habilidad y el juicio de un experto, además, existe gran variabilidad entre la cantidad de polen que se encuentra y la contribución de néctar de cualquier flor, a ello hay que sumar la proliferación de variedades de plantas híbridas sin polen, como la lavanda, que ha complicado enormemente la clasificación de los tipos de miel mediante esta técnica (Escriche et al., 2017).

- El análisis sensorial es muy importante, ya que el consumidor aprecia principalmente la calidad sensorial de la miel y en función de ello volverá a comprar el producto o no. Para que el análisis sea objetivo debe realizarse por un panel de expertos.

- Los análisis físico-químicos pueden ayudar a clasificar la miel, ya que los niveles de algunas características físico-químicas como la conductividad eléctrica, el color o el pH son característicos de determinados tipos de miel.

I.3.2. Métodos actuales

- La resonancia magnética nuclear (RMN) consiste en evaluar el comportamiento de ciertos núcleos atómicos en presencia de un campo magnético externo y proporciona información detallada de la estructura molecular de la muestra. La composición química de cada

miel es diferente, otorgándole un único carácter organoléptico, por ello esta técnica permite determinar el origen botánico de diferentes mieles.

- El análisis de la relación de isótopos de carbono estable (SCIRA) permite detectar adulteraciones en la miel por adición de azúcares con C4, como el jarabe de maíz y el de azúcar de caña.
- La actividad enzimática permite clasificar ciertas mieles, ya que, su contenido en diastasas difiere con el origen botánico (Juan-Borrás, 2016).
- El contenido en azúcares está relacionado con su procedencia botánica, por tanto, su composición difiere de unas mieles a otras, siendo la relación de monosacáridos fructosa y glucosa diferente entre variedades.

I.3.3. Métodos emergentes

- La espectroscopía Raman ha demostrado ser una técnica muy útil para la diferenciación botánica de las mieles, además de ser una técnica simple, rápida y no destructiva, que aporta información química y estructural de cualquier compuesto orgánico para su identificación.
- La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (F-TIR) ha sido utilizada para identificar el origen botánico y geográfico de una miel y para detectar posibles adulteraciones de la misma. Aporta información molecular de una muestra y se suele usar combinada con un análisis multivariante (PCA) para diferenciar entre grupos de muestras.
- La colorimetría diferencial de barrido (DSC) es la menos propuesta para el análisis de mieles en trabajos reportados, debido a que es necesario seguir investigando el comportamiento térmico de las mieles de diferente procedencia geográfica y botánica (Sobrino-Gregorio et al., 2017).
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido utilizada para la identificación del origen botánico de la miel y se basa en la amplificación de un fragmento de ADN obteniendo miles de copias (Sobrino-Gregorio et al., 2019).
- Las lenguas electrónicas se encuentran entre las técnicas analíticas más prometedoras por su bajo coste y respuesta rápida. Esta técnica consiste en un sistema multisensor que genera una huella digital basada en patrones de reconocimiento y ha permitido diferenciar muestras según su origen botánico y geográfico, aunque es necesario seguir investigando (Escriche et al., 2012).
- El análisis de compuestos volátiles mediante Cromatografía de gases. Es una de las técnicas más prometedoras. Aunque hoy en día esta técnica se sitúa como una potente herramienta científica para garantizar la procedencia botánica de las mieles, todavía no se utiliza como técnica de rutina a nivel comercial (Escriche et al., 2011, Sobrino, 2020).

El gran adelanto en la aplicación de esta metodología radica en la mejora introducida en los métodos de extracción de la fracción volátil. Estas técnicas de extracción de compuestos volátiles, se basan en la polaridad y el grado de volatilidad de dichos compuestos. Algunas de ellas son la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE), la extracción con solvente en ultrasonidos (USE), o la destilación-extracción simultánea (SDE). Estas técnicas utilizan disolventes orgánicos para la extracción de los compuestos volátiles de la muestra y, además, requieren de un calentamiento de la muestra a elevadas temperaturas, lo que generan compuestos no deseados (Castro et al., 2003; Alissandrakis et al., 2003; Castro et al., 2006).

Otra técnica de extracción de volátiles en mieles es la purga y trampa y el espacio de cabeza. Una aplicación de esta última es la llamada SPME (microextracción en fase sólida), hoy en día ampliamente utilizada (Castro et al., 2006).

Es bien conocido que cada miel monofloral tiene su propio aroma y sabor, dependiendo de su origen botánico, así pues, la fracción volátil es clave para poder correlacionar la presencia de ciertos compuestos originados en el néctar con la fuente floral (Alissandrakis et al., 2003). Por ello, dichas técnicas se han utilizado para el análisis de componentes volátiles en la miel y para la caracterización de mieles de diferentes orígenes florales (Escriche et al., 2011).

II.OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1 OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo ha sido evaluar la capacidad de la información que proporciona la fracción volátil (extraída mediante microextracción en fase sólida y analizada por GC-MS) en la diferenciación de mieles atendiendo a su monofloralidad.

Para alcanzar dicho objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Identificar los compuestos en la fracción volátil de las cinco variedades de mieles estudiadas.
- Evaluar el efecto de la fracción volátil en la diferenciación de mieles monoflorales.

II.2 PLAN DE TRABAJO

Para cumplir con los objetivos se planteó el siguiente plan de trabajo:

- Revisión bibliográfica de estudios similares en los que se haya analizado la fracción volátil de mieles por SPME-GC-MS.
- Preparación de las muestras objeto de estudio para su análisis cromatográfico por GC-MS con fibra SPME.
- Análisis de la señal cromatográfica con la finalidad de identificar compuestos volátiles en las 5 variedades de miel estudiadas.
- Comparación de perfiles cromatográficos entre variedades.
- Análisis estadístico de los datos obtenidos para evaluar el efecto de la fracción volátil en la diferenciación entre variedades.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 MUESTRAS DE MIEL

En el presente estudio se analizaron 69 muestras de miel cruda, de 5 variedades diferentes, siendo, 20 muestras de azahar, 8 de eucalipto, 22 de lavanda, 10 de romero y 9 de tomillo, procedentes de diferentes regiones de España. En la tabla 4 del apartado de anexos se detalla la relación de muestras analizadas según variedad y referencia asignadas por el laboratorio LABMIEL. A las muestras del presente estudio se les realizó previamente el análisis polínico en este laboratorio. Como ejemplo del polen representativo de cada variedad botánica, se muestran sus micrografías en la figura 1 (x400).

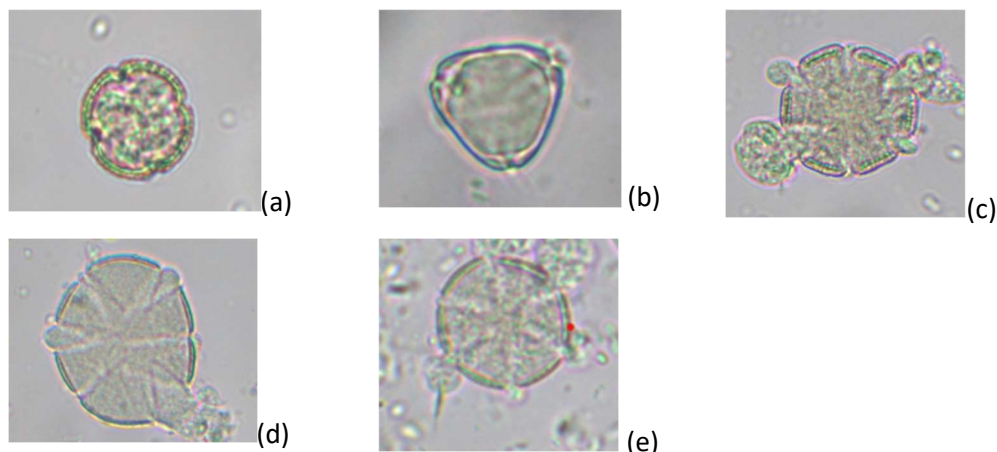


Figura 1. Micrografía de pólenes de azahar (a), eucalipto (b), lavanda (c), romero (d), y tomillo (e) (Fuente LABMIEL).

III.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL

En cada determinación, se pesaron 8 g de miel, en viales de 20 mL con tapón de rosca equipados con septos de PTFE/Sil. Seguidamente, se añadieron 1 mL de agua bidestilada, 2 mL de disolución saturada de NaCl en agua bidestilada y 1g de perlas de vidrio, para facilitar la homogeneización. Posteriormente se agitaron los viales en vórtex, durante 2 minutos, hasta la completa homogeneización de la muestra.

III.3 EQUIPOS, MÉTODO Y CONDICIONES DE TRABAJO

La extracción de los compuestos volátiles de la miel, se realizó aplicando la técnica de SPME con una fibra tipo DVB/CAR/PDMS (divinyl benzene/carboxen/polydimethylsiloxane) de 50/30 μm . La fibra se acondicionó a 260°C durante 3 min. La temperatura de extracción de la fracción volátil de la muestra fue 50°C, con una agitación de 250 rpm, durante 30 min, y el tiempo de desorción de la muestra en el inyector a 250°C fue de 3 min en modo splitless. El sistema de inyección utilizado fue un sistema automatizado PAL RSI 120. Se utilizó helio como gas portador con un flujo constante de 1 mL/min. La separación de los compuestos y el posterior análisis se realizó con una columna DB WAX (30m x 0,25mm x 0,25 μm) en un cromatógrafo de gases Intuvo 9000 GC acoplado a un detector de masas 7000D GC/TQ (Agilent). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura inicial del horno 35°C (mantenida durante 3min), incremento de 5°C/min hasta 215°C (rampa 1), seguidamente se aumentó 30°C/min hasta 250°C (rampa 2), manteniéndose durante 6 min, siendo la duración total del cromatograma de 46 min. Las condiciones del detector de masas fueron: modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV, con un rango de masas de m/z 40-280.

La identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus espectros de masas obtenidos en las muestras, con los existentes en la base de datos del equipo (librería NIST 17.L, National Institute of Standards and Technology) y comparación con datos bibliográficos.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL

Una vez analizadas las muestras, se procedió a la identificación de los compuestos de su fracción volátil. Esta identificación requirió de un tiempo de entrenamiento previo ya que, a pesar de que LABMIEL tiene mucha experiencia en el análisis de compuestos volátiles, era la primera vez que se trabajaba con la técnica de microextracción en fase sólida (SPME). Además, fue necesario familiarizarse con el funcionamiento del equipo GC-MS y del programa para el procesamiento de los cromatogramas, MassHunter (Unknown) que lleva asociado, ya que había sido recientemente adquirido.

Se realizó un estudio bibliográfico previo, para conocer los compuestos identificados por otros autores en muestras de miel a las que se les había aplicado también SPME-GC-MS. Esto fue necesario para ayudar en la identificación de compuestos volátiles de las mieles analizadas en el presente trabajo. Para la comprobación de los compuestos, se tuvo en cuenta que un mismo compuesto puede ser denominado de forma distinta en función de la fuente. Por ejemplo, el hotrienol también se puede encontrar con su sinónimo, 1,5,7-octatrien-3-ol,3,7-dimethyl.

La figura 2 muestra a simple vista el diferente perfil cromatográfico que presentan las variedades de miel estudiadas. Sin embargo, entre muestras procedentes de la misma variedad este perfil era muy similar.

El análisis de la señal cromatográfica se llevó a cabo por orden de tiempo de retención, con la finalidad de identificar los picos que realmente correspondían a compuestos volátiles o había que descartarlos por ser considerados ruido.

La primera condición para que una señal se considerara como pico, correspondiente a un compuesto, era que estuviera bien definido y, además, su forma y sus masas de rotura debían coincidir en todas las muestras en que estuviese presente, ya que estas características son propias del compuesto y no varían.

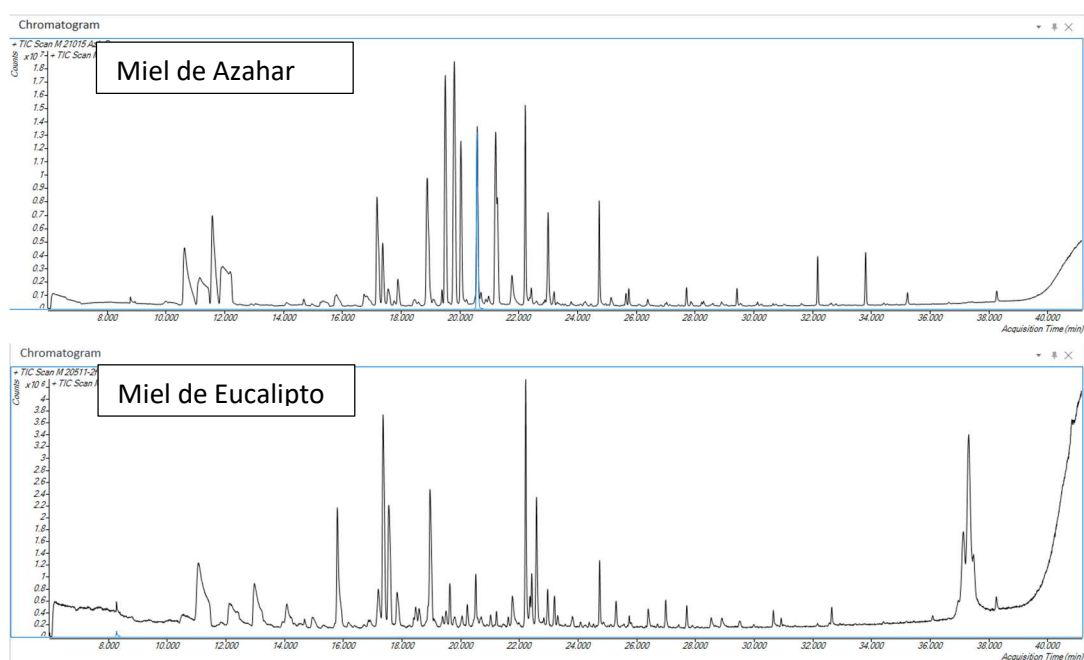
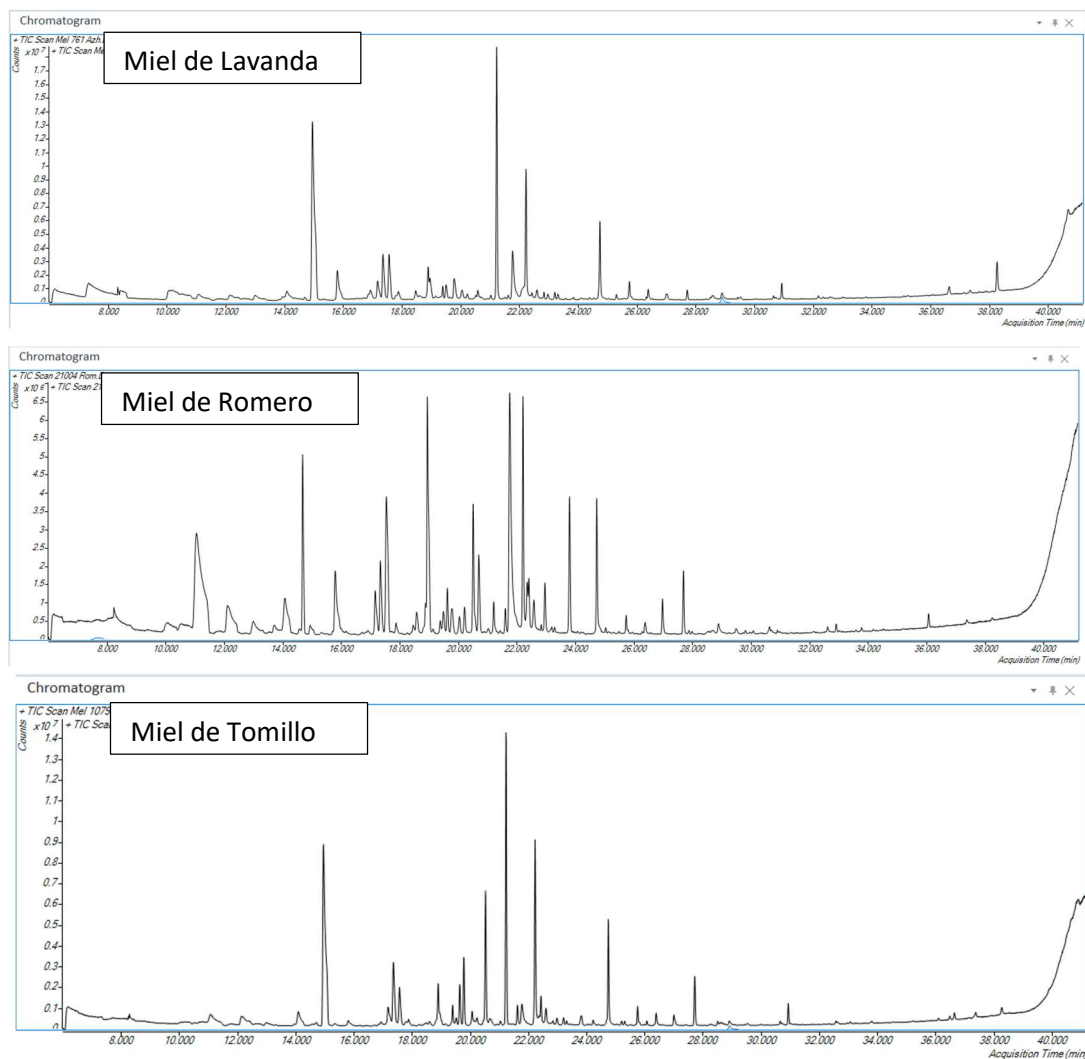


Figura 2. Cromatogramas TIC representativos de la fracción volátil de las mieles de azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo.



Continuación Figura 2. Cromatogramas TIC representativos de la fracción volátil de las mieles de azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo.

La forma de los picos podría ser gaussiana o no. La figura 3.a muestra un ejemplo de pico bien definido con forma gaussiana (correspondiente al compuesto lilac aldehyde D), y la figura 3.b la de un pico bien definido con forma no gaussiana (correspondiente al compuesto benzeneacetaldehyde).

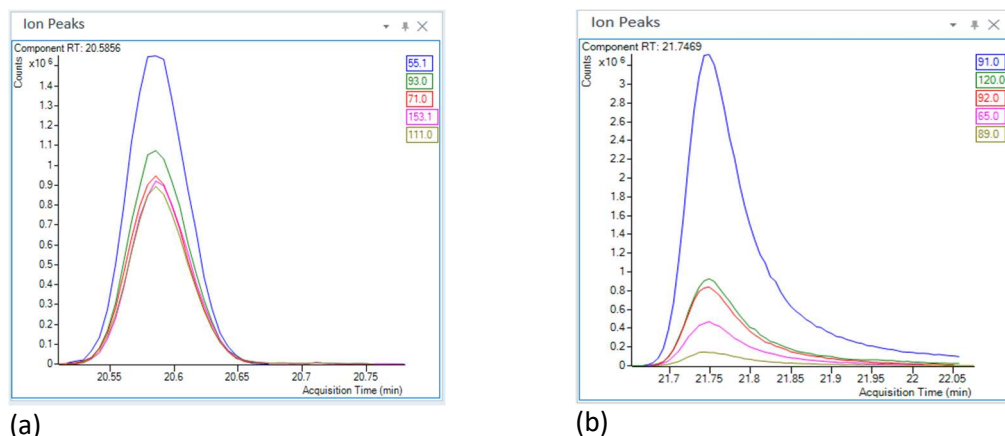


Figura 3. Ejemplo de señales identificadas como picos: (a) compuesto lilac aldehyde D con forma gaussina y (b) compuesto benzeneacetaldehyde con forma no gaussina.

Una vez se consideraba una señal como pico, se comparaba su espectro de masas (diferentes roturas que se producen a 70 eV), con el que proporciona la base de datos de la librería NIST. La figura 4 muestra la presencia de las roturas correspondientes a las masas 55.1, 71.0, 93.0, 111.0 y 153.1, tanto en el pico de una muestra de azahar como en la NIST para el compuesto lilac aldehyde D. Además, la figura 5 muestra la comparación del espectro de masas del compuesto benzeneacetaldehyde (identificado en una muestra de romero) con la librería NIST, en el que se muestra un “match” de 97.1%. Este valor indicado por el programa MassHunter refleja el porcentaje de coincidencia del espectro de masas de un compuesto con el de la base de datos de la librería NIST. Este valor, será mayor cuanto mayor sea esta coincidencia. Así mismo el programa ofrece diferentes opciones de identificación para un mismo pico, asociado a un match factor. Como primera opción siempre se optaba por el de mayor match factor, pero se observó que en algún pico las opciones propuestas por la base de datos NIST como alternativas en segunda o tercera opción con un match factor menor, eran típicos de la miel, al contrario de la primera opción y se decidió optar por ellas. Aunque dicho match factor es de ayuda, no es concluyente y por ello, se realizó de manera simultánea la comparación de compuestos obtenidos por el software con los encontrados en la bibliografía.

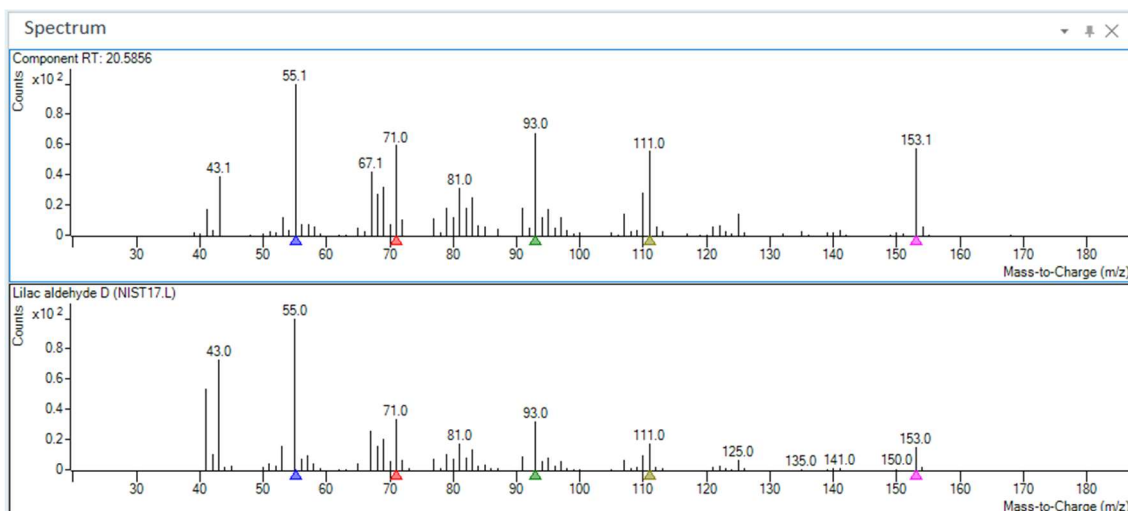


Figura 4. Comparación del espectro de masas del compuesto lilac aldehyde D con la librería NIST.

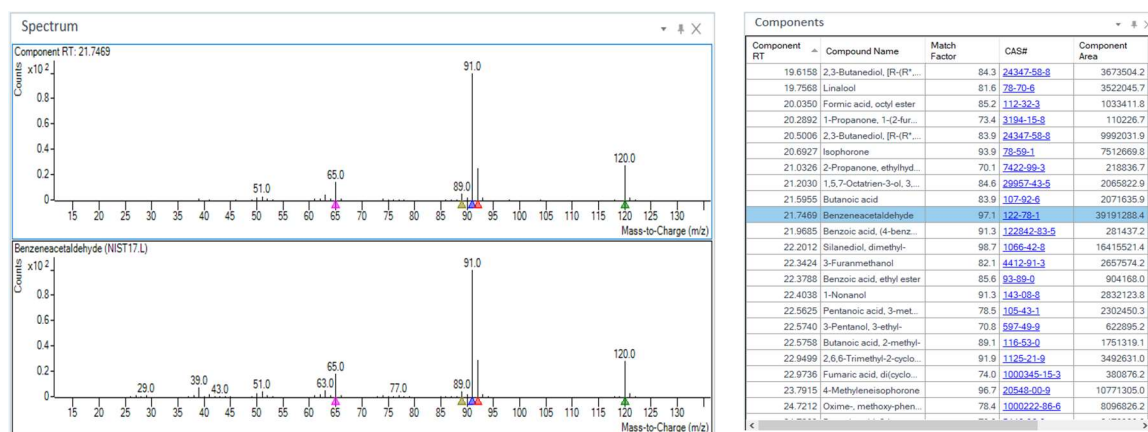


Figura 5. Comparación del espectro de masas del compuesto benzeneacetaldehyde de una muestra de romero con la librería NIST, así como su valor de Match Factor.

Como parte del proceso de identificación de compuestos, hay que tener en cuenta que algunos picos del cromatograma son ruido del sistema y por tanto no se deben de considerar. La figura 6 muestra un ejemplo de esta situación, en la que se observa un pico que no se consideró como compuesto debido a que su forma era irregular y todas sus roturas no eran coincidentes con la NIST.

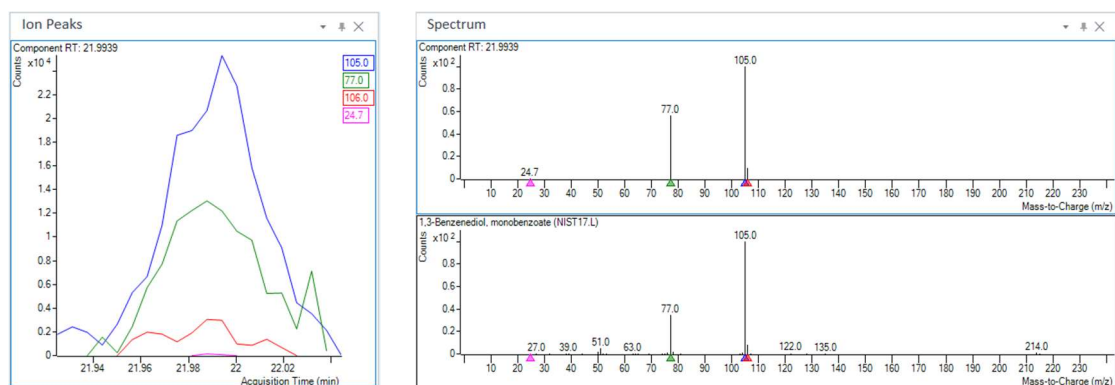


Figura 6. Ejemplo de pico no considerado compuesto y comparación de su espectro de masas con el de la NIST.

El trabajo de identificación de compuestos anteriormente explicado se llevó a cabo en todos los cromatogramas. En total, se identificaron de 116 compuestos en la fracción volátil de las 5 variedades de miel estudiadas, cuya relación se detalla en la tabla 2. Además, esta tabla muestra el valor medio, desviación estándar, máximo y mínimo, así como el resultado del ANOVA para el factor variedad de miel. Se observa que únicamente para 10 compuestos las diferencias entre variedades no fueron significativas. La figura 7 muestra, como ejemplo, diferentes diagramas Box-Whisker resultantes del ANOVA para 4 de estos compuestos (nonanal, isophorone, 3-furanmethanol y benzyl alcohol). Entre estos compuestos, el 3-furanmethanol mostró una gran dispersión entre valores máximos y mínimos para las variedades de eucalipto y lavanda.

Los restantes 106 compuestos mostraron diferencias significativas: 24 al 90%, 26 al 99% y 56 al 99.9%. La figura 8 representa el Box-Whisker resultante del ANOVA para algunos de ellos. El lilac aldehído A y lilac aldehído B fueron significativamente más abundantes (99.9%) en la variedad

azahar. Este mismo comportamiento mostraron el 1-octanol para la variedad eucalipto, coumarin para la variedad lavanda, y jasmone y acetophenone para tomillo, cuyas presencias fueron prácticamente exclusiva de estas variedades.

Otros compuestos también se identificaron únicamente para una variedad en concreto, como es el caso del ethyl linalool en la miel de azahar, el isovaleric acid en la de eucalipto, el methyl salicylate para la variedad romero y el eugenol para la variedad tomillo. Destacaron valores altos de área de 1-heptanol para lavanda, benzaldehyde para romero y octanal para tomillo.

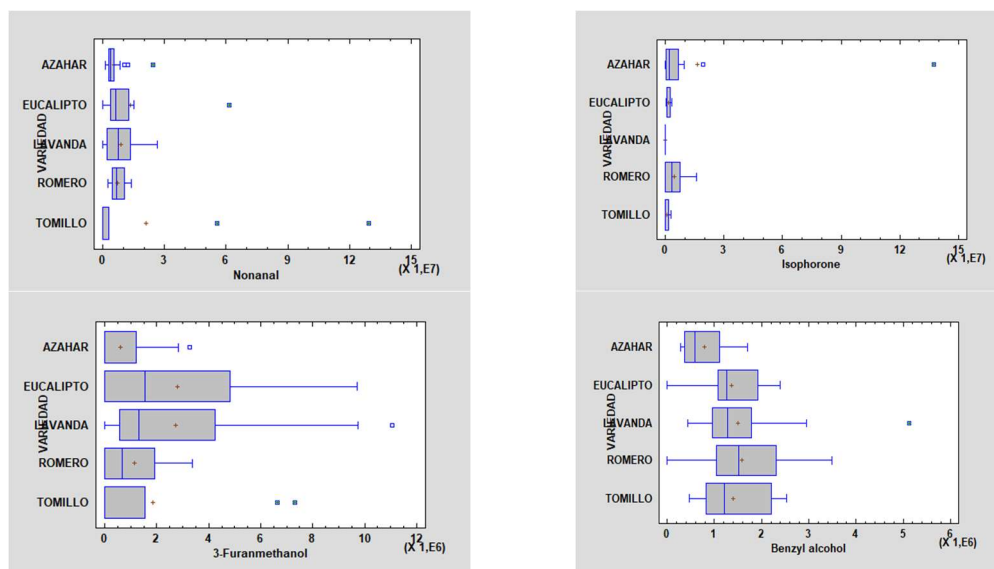


Figura 7. Ejemplos de diagramas Box-Whisker de algunos compuestos volátiles que no mostraron diferencias significativas entre variedades.

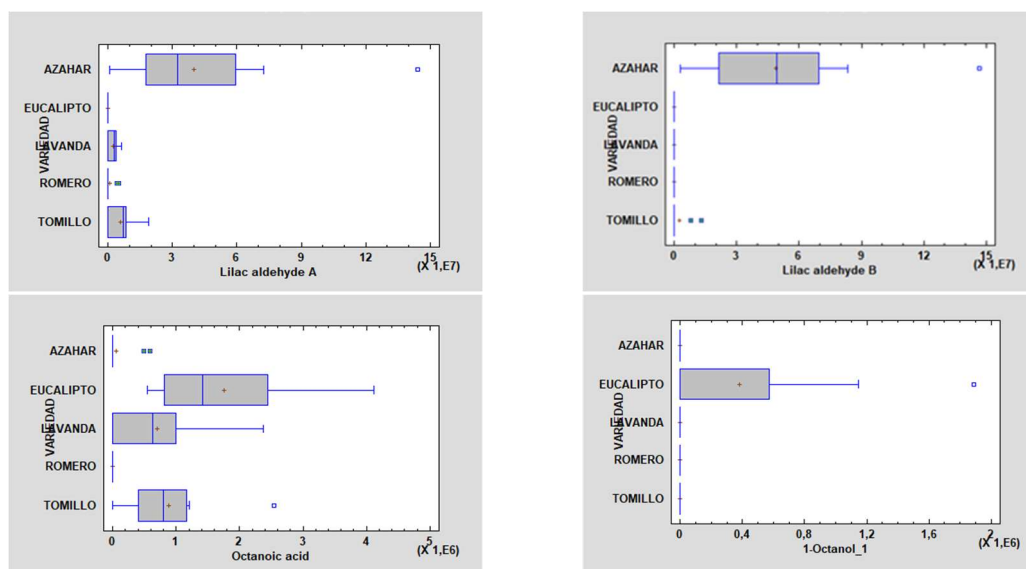
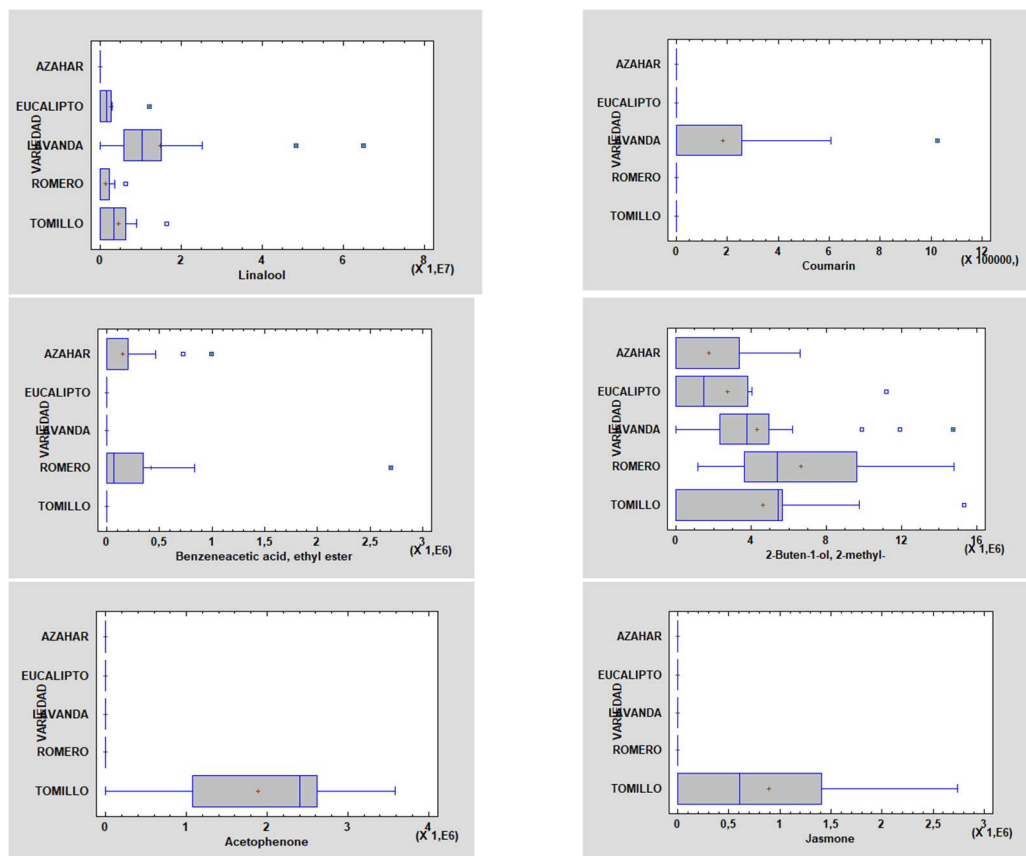


Figura 8. Ejemplos de diagramas Box-Whisker de algunos compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre variedades.



Continuación Figura 8. Ejemplos de diagramas Box-Whisker de algunos compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre variedades.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS en las 5 variedades de miel estudiadas, ordenados por su tiempo de retención (T_R). Los resultados se expresan en áreas (potencias de 10^6) (valores medios y desviación estándar (SD) así como máximos y mínimos); nd =no detectado. Se incluye el resultado del ANOVA para el factor “variedad” (F-ratio y P-value); significación: * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$, ns =no significativo. Las letras indican los grupos homogéneos del ANOVA.

COMPUESTOS	TR	AZAHAR		EUCALIPTO		LAVANDA		ROMERO		TOMILLO		F-ratio
		Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	
Hexanal	7.34	nd	nd	nd	nd	0-230	53 (61)	nd	nd	nd	nd	3.54*
Oxirane, 2-(1,1-dimethylethyl)-3-ethyl-, cis-	11.04	0-49	26 (11) ^a	5-72	30 (23) ^{bc}	0-27	9 (6) ^a	0-127	50 (36) ^c	0-32	16 (10) ^{ab}	5.10**
3-Buten-1-ol, 3-methyl-	12.13	nd	nd	0-10	8 (2) ^{bc}	0-14	6 (3) ^b	0-22	11 (6) ^c	0-18	10 (4) ^c	9.71***
Octanal	12.84	nd	nd	nd	nd	0-13	5 (4) ^a	nd	nd	0-87	60 (37) ^b	2.92*
Acetoin	12.98	0-2	1.0(0.5) ^a	7-104	24 (33) ^b	0-5	2 (1) ^a	nd	nd	nd	nd	7.95***
2-Buten-1-ol, 2-methyl-	14.08	0-7	4 (2) ^a	0-11	5 (4) ^{ab}	0-15	5 (3) ^{bc}	1-15	7 (4) ^c	0-15	8 (4) ^{abc}	3.25*
2-Hexanol, 5-methyl-	14.14	0-5	3.5 (0.7)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,73*
1-Hexanol	14.94	0-2	1.1 (0.3) ^a	0-7	3 (3) ^a	11-575	138 (156) ^b	0-6	2 (2) ^a	0-99	28 (36) ^a	8.25***
Nonanal	15.78	1-24	5 (5) ^a	0-62	15 (21) ^{ab}	0-27	10 (8) ^{ab}	2-14	7 (3) ^{ab}	0-129	48 (60) ^b	ns
Hexane, 2,3,3-trimethyl-	16.74	0-10	5 (3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15.17***
Styrene, 3,4-dimethyl-	16.85	nd	nd	0-6	3 (3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.72**
1-Hexanol, 4-methyl-	16.90	nd	nd	nd	nd	0-13	4 (4)	nd	nd	nd	nd	2.7*
Trans Linalool oxide I	17.17	8-41	21 (10) ^c	nd	nd	0-15	7 (3) ^b	0-19	8 (6) ^b	0-11	6 (2) ^{ab}	23.03***
cis-Linaloloxide	17.19	nd	nd	0-7	5 (2) ^c	nd	nd	nd	nd	0-5	4 (1) ^b	10.82***
4-Methylpentyl 2-methylbutanoate	17.21	nd	nd	0-578	156 (241) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.87**
Acetic acid	17.37	6-41	19 (9) ^{bc}	13-49	24 (12) ^{bc}	9-54	25 (14) ^c	3-14	8 (3) ^a	4-42	16 (14) ^{ab}	4.61**
Furfural	17.50	3-20	8 (4) ^a	5-37	19 (12) ^b	0-26	10 (6) ^a	4-32	18 (10) ^b	0-32	10 (11) ^a	8.30***
1H-Imidazole, 1,5-dimethyl-	17.55	nd	nd	nd	nd	0-29	13 (8) ^b	nd	nd	0-4	3.7 (0.4) ^a	5.19**

Tabla2. Continuación.

COMPUESTOS	TR	AZAHAR		EUCALIPTO		LAVANDA		ROMERO		TOMILLO		F-ratio
		Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	
1-Heptanol	17.58	nd	nd	0-3	2.59(0.08) ^a	0-201	33 (54) ^b	nd	nd	0-11	8 (4) ^a	2.73*
4-Octanone, 5-hydroxy-2,7-dimethyl-	17.84	nd	nd	2-638	94 (220)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.96*
Trans Linalool oxide II	17.88	2-9	5 (2) ^b	0-4	3.3 (0.4) ^a	0-5	2 (1) ^a	0-3	1.8 (0.9) ^a	0-3	1.9 (0.7) ^a	12.49***
1-Hexanol, 2-ethyl-	18.39	0-2	1.7 (0.6) ^{ab}	0-3	2 (2) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns
Decanal	18.44	0-14	8 (7) ^a	nd	nd	0-7	2 (2) ^a	nd	nd	0-13	11 (3) ^a	ns
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	18.58	0-2	0.9 (0.5) ^a	0-3	2.6 (0.7) ^b	0-3	1.1 (0.8) ^a	0-3	1.9 (0.7) ^b	0-3	2.6 (0.7) ^b	13.52***
Dill ether	18.87	0-43	12 (11)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.43***
Benzaldehyde	18.96	0-29	8 (7) ^a	2-14	9 (5) ^a	0-10	5 (2) ^a	5-43	23 (11) ^b	0.8-50.7	20 (18) ^b	11.05***
2,5-Dihydroxybenzaldehyde	19.39	0-4	2 (1) ^{ab}	0.4-3.3	1 (1) ^{bc}	0-3	2.2 (0.5) ^c	0-2	1.2 (0.8) ^a	0-1	0.9 (0.4) ^a	8.04***
Lilac aldehyde A	19.50	0.6-144.1	39 (32) ^b	nd	nd	0-6	4 (1) ^a	0-5	4.6 (0.4) ^a	0-19	10 (5) ^a	15.54***
2,3-Butanediol I	19.63	0-4	1 (1) ^a	2-81	24 (29) ^b	0-47	10 (12) ^a	0-5	3 (2) ^a	1-20	6 (6) ^a	5.69***
Linalool	19.77	nd	nd	0-12	4 (5) ^a	0-65	15 (15) ^b	0-6	3 (2) ^a	0-16	8 (5) ^a	8.44***
Lilac aldehyde B	19.81	0-147	48 (32) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-13	10 (3) ^a	25.07***
Lilac aldehyde C	20.03	1-93	25 (21) ^b	nd	nd	0-4	2.9 (0.6) ^a	0-3	2 (1) ^a	0-11	6 (3) ^a	15.05***
Dimethyl ether	20.05	nd	nd	0-0.9	0.7 (0.3) ^{ab}	0-8	3 (2) ^b	nd	nd	nd	nd	3.95**
1-Octanol I	20.07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-3	1.0 (0.8) ^b	0-5	3 (1) ^b	6.78***
Benzene, 1-fluoro-4-methyl-	20.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.8	0.7 (0.1) ^c	0-0.8	0.6 (0.2) ^{bc}	4.28**
Propanoic acid, 2-methyl-	20.23	nd	nd	0-62	15 (24) ^b	nd	nd	0-3	2.4 (0.4) ^a	0-5	3 (2) ^a	4.08**
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	20.24	0-3	1.3 (0.7) ^a	nd	nd	0-10	3 (2) ^b	0-1	0.9 (0.4) ^a	nd	nd	7.94***
2,3-Butanediol II	20.52	0-7	3 (2) ^a	2-131	26 (43) ^b	0-107	29 (24) ^b	0-14	7 (4) ^{ab}	3-40	13 (14) ^{ab}	2.63*
Lilac aldehyde D	20.59	0.3-91.4	28 (21) ^b	nd	nd	0-5	2 (1) ^a	0-4	3 (1) ^a	0-12	7 (3) ^a	18.69***
Ethanone, 1-(2-methyl-1-cyclopenten-1-yl)-	20.69	0-7	2 (2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.32*

Tabla2. Continuación.

COMPUESTOS	TR	AZAHAR		EUCALIPTO		LAVANDA		ROMERO		TOMILLO		F-ratio
		Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	
Isophorone	20.72	0-137	20 (46) ^b	0.3-3.2	1 (1) ^{ab}	nd	nd	0-16	6 (5) ^{ab}	0-3	2.0 (0.8) ^{ab}	ns
Hotrienol I	21.22	0-21	8 (5) ^a	0-9	3 (3) ^a	6-340	63 (71) ^b	0-18	4 (6) ^a	8-35	21 (11) ^a	6.70***
Benzoic acid, methyl ester	21.34	0-0.3	0.26 (0.03) ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.8	0.4 (0.2) ^b	6.52***
Butanoic acid, 4-hydroxy-	21.46	nd	nd	0-1	0.7 (0.5) ^b	nd	nd	0-0.3	0.26 (0.06) ^a	nd	nd	5.28**
Butanoic acid	21.61	0-1	0.7 (0.5) ^a	0-11	3 (4) ^a	0-21	6 (6) ^a	0-83	11 (29) ^a	1-199	91 (78) ^b	17.34***
Benzeneacetaldehyde	21.77	3-20	9 (5) ^{ab}	2-9	4 (2) ^a	3-110	31 (26) ^c	5-39	19 (12) ^{abc}	5-47	21 (15) ^{bc}	6.08***
Acetophenone	21.98	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-4	2.4 (0.9)	30.07***
2-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-enone	22.35	0-10	5 (5) ^b	nd	nd	nd	nd	0-6	4 (3) ^{ab}	nd	nd	ns
3-Furanmethanol	22.36	0-3	2.0 (0.9) ^a	0-10	4 (3) ^b	0-11	3 (3) ^b	0-3	2.3 (0.9) ^{ab}	0-10	4 (3) ^{ab}	ns
Benzoic acid, ethyl ester	22.38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-7	3 (3) ^b	0-4	2 (1) ^b	3.94**
Cyclopentane, 2-ethyl-1,1-dimethyl-	22.41	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-1	1.0 (0.4)	6.14***
1-Octanol II	22.42	nd	nd	0-2	1.5 (0.5)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.37**
2(3H)-Furanone, 5-ethenyldihydro-5-methyl-	22.43	0-4	2.3 (0.9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	43.44***
1-Nonanol	22.45	nd	nd	0-34	15 (14) ^b	0-4	3 (1) ^a	0-3	2.2 (0.6) ^a	0-6	4 (1) ^a	7.16***
Isovaleric acid	22.57	nd	nd	6-95	26 (29)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12.38***
Acetic acid	22.58	0-0.4	0.38 (0.09) ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-10	4 (4) ^b	6.43***
Butanoic acid, 2-methyl-	22.60	0-1	1.0 (0.4) ^a	nd	nd	0-15	4 (4) ^a	0-23	4 (8) ^a	1-70	27 (26) ^b	12.38***
2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	22.98	0-23	6 (6) ^b	1-18	4 (6) ^b	0-4	0.9 (1.0) ^a	0-15	5 (5) ^b	0-5	2 (2) ^{ab}	2.68*
1- p-Menthene-9-al	23.00	0-18	6 (5)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19.64***
Pentanoic acid, anhydride	23.14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-2	0.7 (0.7)	3.34*
alfa Terpineol acetate	23.20	0-3	1.5 (0.6) ^{bc}	0-2	1.5 (0.6) ^{bc}	0-2	1.0 (0.5) ^c	0-0.5	0.49 (0.01) ^a	0-0.9	0.7 (0.2) ^{ab}	3.54*

Tabla2. Continuación.

COMPUESTOS	TR	AZAHAR		EUCALIPTO		LAVANDA		ROMERO		TOMILLO		F-ratio
		Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	
Lilac alcohol A	23.78	0-7	3 (2) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-3	1.9 (0.5) ^{ab}	3.53*
4-Methyleneisophorone	23.81	0-43	9 (14) ^a	0-2	1.3 (0.7) ^a	0-7	5 (2) ^a	0-35	14 (13) ^b	0-5	4 (1) ^a	3.71**
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	23.82	nd	nd	0-0.3	0.3 (0.2)	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	4.29**
Pentanoic acid	24.08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-2	1.3 (0.6)	3.49*
Lilac alcohol B	24.22	0-3	1.9 (0.7) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-2	2.2 (0.3) ^{ab}	6.62***
2(5H)-Furanone	24.26	nd	nd	0-0.8	0.6 (0.4) ^{ab}	0-1	0.6 (0.3) ^b	nd	nd	0-0.8	0.73 (0.08) ^{ab}	3.96**
1-Decanol	24.68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.6	0.6 (0.1)	3.88**
Proline, 2-methyl-5-oxo-, methyl ester	24.71	nd	nd	nd	nd	0-0.9	0.8 (0.4) ^b	nd	nd	0-0.4	0.3 (0.1) ^{ab}	2.83*
Acido benzoico 2 amino 4methyl	24.74	3-18	12 (5) ^{bc}	3-16	9 (6) ^{ab}	11-20	14 (3) ^c	6-11	8 (2) ^a	4-17	11 (4) ^{ab}	5.69***
Methyl salicylate	24.76	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-3	2.3 (0.5)	nd	nd	12.65***
1,4-Cyclohexanedione, 2,2,6-trimethyl-	24.83	nd	nd	0-2	2 (0,9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.03**
Benzeneacetic acid, ethyl ester	25.05	0-1	0.4 (0.3) ^{ab}	nd	nd	nd	nd	0-3	0.8 (1.0) ^b	nd	nd	2.94*
4,5-Octanediol, 2,7-dimethyl-	25.10	nd	nd	0-23	10 (11)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.78**
Lilac alcohol C	25.19	0-3	1.4 (0.8) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-3	2 (1) ^b	4.44**
p-Mentha-1,5-dien-7-ol	25.30	nd	nd	0-2	0.9 (0.6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5.72***
Benzaldehyde 2,5 dimethyl	25.50	0-0.9	0.83 (0.06) ^b	nd	nd	nd	nd	0-0.3	0.28 (0.07) ^{ab}	nd	nd	2.58*
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	25.68	0-1	0.8 (0.4)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns
Lilac alcohol D	26.07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-2	1.2 (0.8)	3.07*
Naphthalene, 2-methyl-	26.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.4	0.3 (0.1) ^c	0-0.4	0.2 (0.1) ^b	11.49***
Hexanoic acid	26.38	0-2	1.0 (0.5) ^a	0.8-3.3	1.5 (0.9) ^a	0.7-8.7	4 (2) ^a	0-14	5 (8) ^a	1-60	11 (17) ^b	10.84***
Furan, 3-phenyl-	26.42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.4	0.3 (0.1) ^b	0-0.7	0.3 (0.2) ^b	10.73***
p-cymene-8-ol	26.44	nd	nd	0-3	2 (1)	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	3.06*

Tabla2. Continuación.

COMPUESTOS	TR	AZAHAR		EUCALIPTO		LAVANDA		ROMERO		TOMILLO		F-ratio
		Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	
Phenol, 2-methoxy-	26.60	nd	nd	0-0.8	0.4 (0.4) ^a	nd	nd	0-0.7	0.4 (0.4) ^a	0-2	0.9 (0.7) ^b	4.99**
Benzyl alcohol	26.99	0-2	0.8 (0.5) ^a	0-2	1.6 (0.5) ^{ab}	0-5	1 (1) ^b	0-3	1.8 (0.9) ^b	0.5-2.5	1.5 (0.9) ^{ab}	ns
Benzoic acid, m-hydroxyphenyl ester	27.27	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-3	1 (1)	4.27**
Phenylethyl Alcohol	27.71	2-11	5 (2) ^b	0.9-10.6	3 (3) ^{ab}	1-5	3 (1) ^a	0-9	4 (3) ^{ab}	4-15	4 (3) ^c	5.97***
Benzene, 1-isocyano-3-methyl-	27.90	0-0.7	0.4 (0.2) ^b	0-2	1.4 (0.6) ^c	nd	nd	0-0.2	0.15 (0.05) ^a	0-0.3	0.28(0.07) ^{ab}	10.03***
p-mentha-1-en-9-ol	28.26	0-2	0.8 (0.6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.54***
Jasmone	28.33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-3	1.3 (0.8)	14.02***
cis-3-Hexenyl iso-butyrate	28.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.4	0.40 (0.03)	22.89***
Hotrienol II	28.52	nd	nd	nd	nd	0-2	0.8 (0.6)	nd	nd	nd	nd	9.45***
Heptanoic acid	28.57	nd	nd	nd	nd	0-3	1.4 (0.8)	nd	nd	nd	nd	4.37**
4-Hexenoic acid	28.65	nd	nd	nd	nd	0-4	2 (1) ^a	nd	nd	0.1-61.3	11 (19) ^b	9.79***
2,5-Furandicarboxaldehyde	28.90	0.5-6.4	2 (2) ^a	0.6-4.0	2 (1) ^a	0.7-10.9	3 (3) ^a	0-7	4 (2) ^a	0-5	3 (2) ^a	ns
p-Mentha-1,8-dien-7-ol	29.42	0-3	1.3 (0.9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.28***
2-Furoic acid	29.50	nd	nd	nd	nd	0-2	0.8 (0.5) ^b	0-0.4	0.30 (0.07) ^{ab}	0-0.4	0.6 (0.2) ^{ab}	2.64*
Phenol	29.54	0-0.4	0.25 (0.09) ^{ab}	0-0.5	0.3 (0.1) ^{bc}	0-0.4	0.28 (0.09) ^{ab}	0-0.2	0.194 (0.007) ^a	0-0.7	0.3 (0.2) ^c	4.52**
Benzofuran, 2-methyl-	30.10	nd	nd	0-0.2	0.1 (0.1) ^{bc}	nd	nd	0-0.2	0.14 (0.06) ^c	Nd	nd	4.80**
Octanoic acid	30.64	0-0.6	0.54 (0.07) ^a	0.6-4.1	2 (1) ^c	0-2	0.9 (0.6) ^b	nd	nd	0-3	0.8 (0.6) ^b	13.46***
1,3-Diacetin	30.93	0-3	2 (1) ^a	0-0.9	0.6 (0.4) ^a	0-15	4 (4) ^b	0-6	1 (2) ^{ab}	0-4	4 (4) ^{ab}	2.62*
p-Cresol	31.01	nd	nd	nd	nd	0-0.5	0.3 (0.2) ^a	nd	nd	0-1	0.4 (.,3) ^b	6.75***
3(2H)-Furanone, 4-hydroxy-5-methyl-	31.71	nd	nd	nd	nd	0-2	1.0 (0.6)	nd	nd	Nd	nd	3.86**
Ethyl linalool I	32.17	0.9-27.5	7 (6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	15.99***

Tabla2. Continuación.

COMPUESTOS	TR	AZAHAR		EUCALIPTO		LAVANDA		ROMERO		TOMILLO		F-ratio
		Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	Max-min	MEDIA (SD)	
Eugenol	32.56	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-0.9	0.7 (0.2)	14.53***
Nonanoic acid	32.64	nd	nd	0-11	4 (4) ^b	nd	nd	nd	nd	0-4	3 (1) ^a	8.85***
Thymol	32.93	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-1	0.8 (0.6) ^b	0-0.3	0.21 (0.07) ^{ab}	3.70**
3-Aminoacetophenone	33.44	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-2	0,6 (0,6)	4.71**
Methyl anthranilate	33.80	0.8-12.9	5 (3) ^b	0-0.2	0.17 (0.06) ^a	nd	nd	0-0.7	0.2 (0.2) ^a	0-0.6	0.3 (0.1) ^a	20.66***
Pyranone	34.42	0-5	1 (2) ^a	0-10	4 (4) ^{ab}	0-32	10 (12) ^b	nd	nd	0-15	10 (11) ^{ab}	ns
Ethyl linalool II	35.23	0-2	1.1 (0.6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11.77***
Fumaric acid, di(cyclohex-3-enylmethyl) ester	35.67	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-1	0.7 (0.5)	6.71***
Phenol, 2,3,5-trimethyl-	36.09	0-7	1 (2) ^b	0-1	0.6 (0.4) ^{ab}	nd	nd	0-5	2 (2) ^b	0-2	0.8 (0.9) ^{ab}	2.54*
Coumarin	37.31	nd	nd	nd	nd	0-1	0.4 (0.3)	nd	nd	nd	nd	4.76**
Benzoic acid	37.49	0-0.2	0.18 (0.06) ^a	nd	nd	0-10	2 (3) ^a	nd	nd	0-19	6 (6) ^b	17.49***
2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy-	39.64	0-0.3	0.22(0.07) ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0-1	0.92 (0.05) ^b	3.38*

IV.2 EFECTO DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL EN LA DIFERENCIACIÓN DE MIELES DE DISTINTAS VARIEDADES

Con la finalidad de describir el efecto global del tipo de miel sobre los compuestos volátiles, considerando todos ellos de forma conjunta, se ha aplicado un Análisis de Componentes Principales (PCA). La figura 9 muestra la primera y segunda componente del gráfico de las muestras (scores). En este gráfico, la proximidad entre muestras indica similitud entre ellas. A simple vista se observa una clara diferenciación entre la variedad de tomillo, azahar y lavanda. La miel de tomillo situada en el cuadrante derecho y la de lavanda en el izquierdo están asociadas a la componente 1, mientras que la de azahar (con una posición intermedia en el plano), se asocia a la componente 2. Las otras dos variedades (prácticamente sin diferenciación entre ellas) ubicadas en la zona central, no se explicarían con ninguna de estas dos componentes. Esta zona se ha ampliado en la figura 10, para su mejor observación.

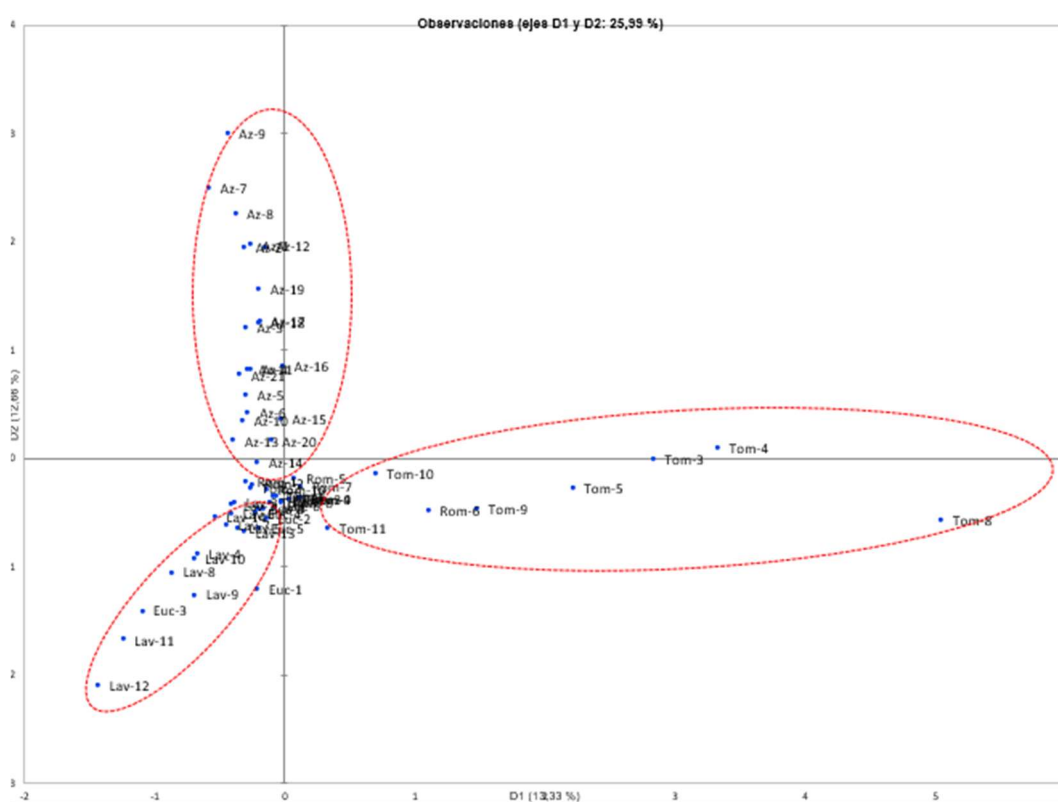


Figura 9. Gráfico de puntuaciones de las muestras del Análisis de Componentes Principales (PCA).

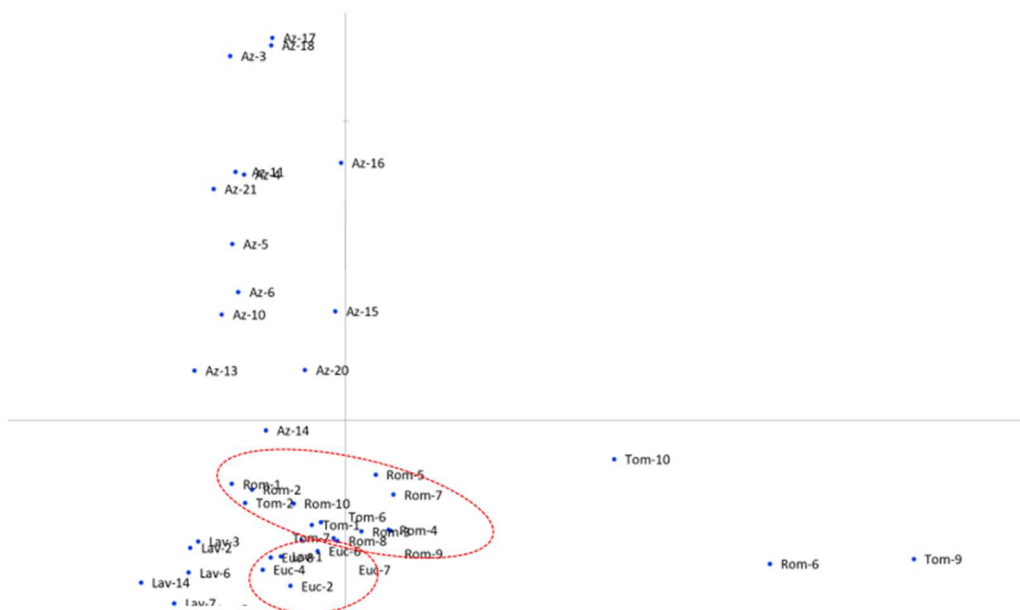


Figura 10. Ampliación de la zona central del gráfico de puntuaciones de las muestras del Análisis de Componentes Principales (PCA).

En la figura 10 se puede observar que algunas muestras de tomillo se sitúan próximas al grupo de las de romero. Ambas plantas son típicas de la vegetación Mediterránea y por tanto crecen juntas en las mismas zonas geográficas, por lo que es lógico que estas mieles procedan del néctar de ambas plantas. El análisis polínico realizado en estas muestras de tomillo por LABMIEL corroboró este hecho al presentar pólenes de ambas especies botánicas. Este hecho demuestra que la técnica empleada en este estudio, puede ser muy útil como instrumento para clasificar de forma fiable las diferentes variedades de miel.

La tabla 3 muestra las correlaciones entre las variables (compuestos volátiles) y los factores tras rotación Varimax para las dos primeras componentes. Se observa que ciertos compuestos volátiles están asociados a los PC, de manera que cuanto mayor es el valor, más importante es el vínculo con el eje correspondiente. En este sentido, se observa que la zona positiva de PC2 está asociada a la miel de citrus, mientras que la positiva de PC1 a tomillo. Las tablas reflejan que los 4 lilacs A, B, C y D, el 1- p-menthene-9-al y el methyl anthranilate son los compuestos que más se correlacionan con la miel de cítrico. Este hecho coincide con otros autores que utilizaron la misma técnica (Alissandrakis et al. 2007, Soria et al. 2009, Machado et al. 2020). Los compuestos que más han resultado correlacionados con el tomillo son: butanoic acid, benzoic acid ethyl ester, 4-hexenoic acid, benzoic acid methyl ester, octanal y acetophenone, entre otros. Algunos de estos compuestos son coincidentes con lo reportado por Soria et al. (2009), Machado et al. (2020) y Karabagias et al. (2019). En este último trabajo los autores coinciden para la variedad de tomillo con el octanal y furan, 3-phenyl-, sin embargo, en ella no detectaron el benzoic acid ethyl ester, aunque sí en otras variedades. La tabla también muestra los compuestos más asociados a la zona negativa de los PC1 y PC2, en donde se ubican las muestras de lavanda. Entre ellos cabría destacar: 3-buten-1-ol, 3-methyl-, 2-buten-1-ol, 2-methyl- y el octanoic acid. Alguno de estos compuestos, como el 3-buten-1-ol, 3-methyl-, 2-buten-1-ol, 2-methyl- y furfural, también fueron detectados por otros autores como Machado et al. (2020) que utilizaron SPME como técnica de extracción o Escrihe et al. (2017) mediante extracción por purga y trampa.

Tabla 3. Correlaciones entre los compuestos volátiles y los factores para las componentes PC1 y PC2 del Análisis de Componentes Principales (PCA).

PC1 (Positivo)	
Jasmone	5,92
Butanoic acid, 2-methyl-	5,50
Hexanoic acid	5,47
Butanoic acid	5,37
Benzoic acid, ethyl ester	5,36
4-Hexenoic acid	5,34
Benzoic acid, methyl ester	4,99
Acetophenone	4,68
Fumaric acid, di(cyclohex-3-enylmethyl) ester	4,66
Benzoic acid, m-hydroxyphenyl ester	4,46
Benzoic acid	4,30
Octanal	4,07
Pentanoic acid	3,47
Furan, 3-phenyl-	2,95
Eugenol	2,945
PC2 (Positivo)	
Lilac aldehyde B	0,93
Lilac aldehyde D	0,93
Lilac aldehyde C	0,92
Lilac aldehyde A	0,91
1- p-Menthene-9-al	0,90
Methyl anthranilate	0,89
Trans Linalool oxide I	0,86
Dill ether	0,84
2(3H)-Furanone, 5-ethenyldihydro-5-methyl	0,83
Ethyl linalool I	0,83
Trans Linalool oxide II	0,81
p-Mentha-1,8-dien-7-ol	0,81
p-mentha-1-en-9-ol	0,76
Ethyl linalool II	0,73
Hexane, 2,3,3-trimethyl-	0,71
PC1 y PC2 (Negativo)	
3-Buten-1-ol, 3-methyl-	-0,428
2-Buten-1-ol, 2-methyl-	-0,350
Octanoic acid	-0,324
Oxirane, 2-(1,1-dimethylethyl)-3-ethyl-, cis-	-0,311
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	-0,282
2(5H)-Furanone	-0,280
1-Nonanol	-0,277
2,5-Furandicarboxaldehyde	-0,228
Furfural	-0,221
alfa Terpineol acetate	-0,218
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	-0,190

Acetic acid	-0,157
2,5-Dihydroxybenzaldehyde,	-0,144
Trans Linalool oxide I	-0,139
2(3H)-Furanone, 5-ethenyldihydro-5-methyl-	-0,135

V. CONCLUSIONES

- En 5 variedades de mieles monoflorales estudiadas (azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo) se han podido diferenciar 116 compuestos volátiles, de los cuales, únicamente 10 de estos compuestos no mostraron diferencias significativas entre tipos de miel.

- La extracción por SPME ha resultado simple y repetitiva y ha permitido obtener compuestos que se pueden asociar a la variedad de miel de azahar como los 4 lilacs A, B, C y D, el 1- p-menthene-9-al y especialmente el methyl anthranilate, considerado un buen marcador en esta variedad de miel por proceder del néctar de la flor de azahar. Además, a la miel de tomillo se asocia el butanoic acid, octanal y furan, 3-phenyl y a la de lavanda el 3-buten-1-ol, 3-methyl-; 2-buten-1-ol, 2-methyl- y furfural. Sin embargo, esta asociación de compuestos no ha sido posible para las variedades de eucalipto y romero.

- Este trabajo pone en evidencia que la técnica aplicada (SPME-GC-MS) es idónea para obtener información sobre la fracción volátil de las mieles que sea útil para su diferenciación monofloral.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ALISSANDRAKIS, E.; DAHERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82 (4): 575-582.
- ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M. (2007) Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100: 396-404.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L.; PÉREZ-COELLO, M.S.; CABEZUDO, M.D. (2003). Analysis of Volatile Compounds of Rosemary Honey. Comparison of Different Extraction Techniques. *Chromatographia*, 57: 227-233.
- CASTRO VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GUCHU, M.; PÉREZ-COELLO, M.S. (2006). Analysis of volatile compounds of eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Eur Food Res Technol*, 224: 27-31.
- DE LORENZO, C.; GUADALIX, M.; GONZÁLEZ, M.; NAVARRO, T.; IGLESIAS, M.; PÉREZ, R.; SANZ, M.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; PUEYO, E.; POLO, M.; SORIA, A.; SANZ, J. (2002). La miel de Madrid. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. Madrid, 221 pp.
- ESCRICHE I.; VISQUERT M.; CAROT J. M.; DOMÉNECH E.; FITO P. (2008) Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior to pasteurization. *Food Science and Technology International*, 14:29.
- ESCRICHE, I.; KADAR, M.; JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH, E. (2011). Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44: 1504-1513.
- ESCRICHE, I.; KADAR, M.; DOMENECH, E.; GIL-SANCHEZ, L. (2012). A potentiometric electronic tongue for the discrimination of honey according to the botanical origin. Comparison with traditional methodologies: Physicochemical parameters and volatile profile. *Journal of Food Engineering*, 109: 449-456.
- ESCRICHE, I.; SOBRINO-GREGORIO, L.; CONCHADO, A.; JUAN-BORRÁS, M. (2017). Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. *Food Chemistry*, 226: 61-68.
- GÓMEZ PAJUELO, A. (2004): Origen botánico de la miel. *Mieles de España y Portugal*. Eds. Montagud, Barcelona, 50-56.
- JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH, E.; HELLEBRANDOVA, M.; ESCRICHE, I. (2014). Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Research International*, 60: 86-94.
- JUAN-BORRÁS, M. (2016). Herramientas analíticas en la clasificación de mieles en base a criterios de calidad e inocuidad. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- KARABAGIAS, I. K.; NIKOLAU, C.; KARABAGIAS, V. K. (2019). Volatile fingerprints of common and rare honeys produced in Greece: in search of PHVMs with implementation of the honey code. *European Food Research and Technology*, 245: 23-39.
- MACHADO, A. M.; MIGUEL, M. G.; VILAS-BOAS, M.; FIGUEIREDO A. C. (2020). Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin- A Review on their Occurrence on Monofloral Honeys. *Molecules*, 25: 374.

OROIAN, M. (2013). Measurement, prediction and correlation of density, viscosity, Surface tension and ultrasonic velocity of different honey types at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 119: 167-172.

PERSANO, L.; PIRO, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35, (1): 39-81.

REAL DECRETO 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel (2003). Boletín Oficial del Estado, 5 de agosto de 2003, núm. 186, pp. 30181-30183.

RODRIGUEZ DE LA CRUZ, D.; SÁNCHEZ REYES, E.; SÁNCHEZ DURÁN, S.; SANCHEZ SANCHEZ, J. (2013). Análisis palinológico de mieles comerciales monoflorales. *Botánica Complutensis*, 37: 171-180.

SOBRINO, L. (2020). Avances en el esclarecimiento de la autenticidad de la miel. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. 165pp.

SOBRINO-GREGORIO, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; ESCRICHE, I. (2017). Thermal properties of honey as affected by the addition of sugar syrup. *Journal of Food Engineering*, 213: 69-75.

SOBRINO-GREGORIO, L.; VILANOVA NAVARRO, S.; PROHENS TOMÁS, J.; ESCRICHE ROBERTO, M.I. (2019). Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control*, 95: 57-62.

SORIA, A. C.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. (2009). SPME followed by GC-MS: a powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. *Eur Food Res Technol*, 228: 579-590.

SUESCÚN, L.; VIT, P. (2008). Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. *Fuerza farmacéutica*, 1: 6-15.

VII. ANEXOS

Tabla 4. Variedad y códigos de las muestras estudiadas según referencia asignada por LABMIEL.

VARIEDAD	REFERENCIA MUESTRAS		VARIEDAD	REFERENCIA MUESTRAS
Azahar	20001		Tomillo	20466
Azahar	20450		Tomillo	20471
Azahar	20472		Tomillo	20497
Azahar	20502		Tomillo	20508
Azahar	20504		Tomillo	20605
Azahar	20508		Tomillo	20639
Azahar	20509		Tomillo	21011
Azahar	20519		Tomillo	Mel 1079
Azahar	20566		Tomillo	Mel 1081
Azahar	20576		Eucalipto	20499
Azahar	21009		Eucalipto	20500
Azahar	21010		Eucalipto	50511
Azahar	21015		Eucalipto	20602
Azahar	21017		Eucalipto	20610
Azahar	21019		Eucalipto	20620
Azahar	21025		Eucalipto	20633
Azahar	21031		Eucalipto	21012
Azahar	Mel 967		Romero	20520
Azahar	Mel 972		Romero	21004
Azahar	I-21168		Romero	21043
Lavanda	20489		Romero	21044
Lavanda	20512		Romero	21050
Lavanda	20513		Romero	21056
Lavanda	20552		Romero	21072
Lavanda	20556		Romero	21112
Lavanda	20557		Romero	Mel 807
Lavanda	21022		Romero	I-21166
Lavanda	21023			
Lavanda	Mel 761			
Lavanda	Mel 766			
Lavanda	Mel 773			
Lavanda	Mel 777			
Lavanda	Mel 780			
Lavanda	Mel 881			
Lavanda	Mel 983			
Lavanda	Mel 20 RF			
Lavanda	Mel 1148			
Lavanda	Mel 1149			
Lavanda	Mel 1153			
Lavanda	I-21165			
Lavanda	I-21167			
Lavanda	I-21169			